



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1685号
学位記番号	第1202号
氏名	安藤 菜奈子
授与年月日	平成31年3月25日
学位論文の題名	<p>Eicosapentaenoic acid suppresses angiogenesis via reducing secretion of IL-6 and VEGF from colon cancer-associated fibroblasts.</p> <p>(colon cancer-associated fibroblast から産生される IL-6 と VEGF に対する EPA の抑制効果とそれに伴う血管新生抑制)</p> <p>Oncology Reports (in press)</p>
論文審査担当者	<p>主査： 片岡 洋望</p> <p>副査： 高橋 智，瀧口 修司</p>

## 【背景】

近年癌の進展には癌間質細胞と癌細胞との相互作用が注目されている。その癌間質相互作用には炎症性サイトカインと VEGF の関与が指摘されている。癌間質細胞、とくに癌関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts, CAFs) から分泌される炎症性サイトカイン Interleukin-6 (IL-6) が VEGF の分泌促進を介して腫瘍内での血管新生を促進し、この制御により癌の進展促進を抑制するという報告がある。一方、 $\omega$ 3 系脂肪酸である eicosapentaenoic acid (EPA) は魚油に多く含まれており、炎症性サイトカインの産生を抑制するとの報告がある。さらに大腸癌細胞株における VEGF の発現を抑制したとの報告もあるが、CAFs に対する影響に関して言及した報告は認めない。

## 【目的】

EPA が、癌間質相互作用に影響して血管新生を制御するかどうか検証をする。そのために CAFs から産生される IL-6 と VEGF の分泌を抑制するかどうかを検討する。さらに分泌の抑制を来たす場合、その経路を明らかにすることにより、EPA の癌間質相互作用における真の役割を解明する。

## 【方法】

線維芽細胞株は大腸癌患者から分離培養して使用した。癌組織から得られた線維芽細胞株を CAFs、正常大腸から得られた線維芽細胞株を colon normal fibroblast (NFs) として用いた。これらの線維芽細胞株から血管新生が惹起されるかどうかを検討した。さらに線維芽細胞が惹起した血管新生を EPA が抑制するかどうかを刺激試験、抑制試験を用いて解析した。具体的には以下に示す通りである。

- 1、線維芽細胞を EPA または lipopolysaccharide (LPS) をそれぞれ添加した状態で培養し、上清を採取した。その上清を用いて ELISA を施行し、それぞれの細胞から分泌される IL-6 と VEGF の濃度を測定した。
- 2、Western blot 法を用いて、EPA が CAFs に対してどのシグナル経路に作用するかを検討した。
- 3、CAFs の作用によって促進された血管新生が EPA によって抑制されるかどうかを Tube formation assay を用いて検討した。Tube formation assay の手技としては EPA (0  $\mu$  M または 30  $\mu$  M) を投与して培養した CAFs の細胞上清を血管内皮細胞株 HUVECs に投与し、HUVECs の tube formation 数を測定した。

## 【結果】

- 1、EPA 投与下の cell viability assay に基づいて 30  $\mu$  M の EPA を実験に用いた。線維芽細胞株の CAFs、NFs はいずれも LPS による刺激で IL-6 産生の促進が認められたが、さらに EPA (30  $\mu$  M) を投与することで CAFs、NFs からの IL-6 産生は抑制された。また EPA (30  $\mu$  M) 投与によって IL-6 の分泌抑制だけでなく、CAFs、NFs からの VEGF の分泌が抑制されることも明らかにした。さらにこの EPA (30  $\mu$  M) による抑制下では、LPS を用いて分泌刺激を行っても CAFs からの IL-6 や VEGF の分泌の亢進は得られなかった。
- 2、MAPK signaling pathway の ERK のシグナルについて検討したところ、EPA (30  $\mu$  M) 投与によって CAF 細胞中の phospho-ERK のシグナルの抑制が認められた。また、ERK のリン酸化阻害剤である U0126 によって、CAF から分泌される IL-6 と VEGF が抑制されることが認められた。よって本研究での、EPA による CAFs からの IL-6、VEGF 分泌抑制は ERK のリン酸化抑制に起因すると考えられた。

3、Tube formation assay で、HUVECs 単独に VEGF を投与すると tube formation の促進が認められた。一方で、HUVECs 単独に EPA を投与した場合、tube formation の著明な抑制が認められた。次に、CAF を培養した際の condition medium を HUVECs に投与し、CAF 由来の血管新生因子の影響を tube formation 数に基づいて評価した。その結果、CAF 単独培養の condition medium を投与した場合は、HUVECs の著明な tube formation の促進が認められた。一方、CAF に EPA を投与して培養した condition medium を HUVECs に投与すると、HUVECs の tube formation が有意に抑制された。さらに EPA 抑制下に VEGF を投与した場合、抑制された tube formation が促進されることが明らかとなった。このことは EPA が CAF から分泌される血管新生因子 (VEGF) の分泌を抑制することで、HUVECs の血管新生を抑制していると考えられた。

#### 【考察】

炎症などによる癌組織内での血管新生の亢進は、主に癌細胞そのものが影響していると考えられており、抗炎症作用因子の癌細胞に対する影響などが報告されてきた。一方で、癌組織内での血管新生を引き起こす VEGF は、癌間質相互作用によって癌細胞よりもむしろ CAFs から分泌される IL-6 に大きく左右されることを我々は報告してきた (BJC, 2014, Nagasaki, Hara et al.)。本研究では、抗炎症作用を持つ EPA が、CAF から分泌される IL-6 を抑制し、さらに VEGF 分泌も抑制することが明らかとなった。またその作用機序は、MAPK signaling pathway において ERK のリン酸化を阻害することにより、IL-6 と VEGF の分泌を抑制していることを解明した。さらにこの EPA による CAF から分泌される VEGF 分泌抑制が HUVECs による tube formation の抑制を来たことが明らかとなった。以上より本研究では、EPA が持つ抗炎症作用によって、癌間質細胞が引き起こす血管新生が抑制されるのではないかと考えられた。

#### 【結語】

抗炎症作用を有する  $\omega$ 3 系脂肪酸 EPA は CAFs に作用して IL-6 と VEGF の分泌抑制を来たことが明らかとなった。EPA が癌細胞だけでなく、癌間質細胞にも作用することが明らかとなり、血管新生阻害薬との併用により様々な効果が期待できるのではないかとと思われる。

## 論文審査の結果の要旨

【背景】近年癌の進展には癌間質細胞と癌細胞との相互作用が注目されている。癌間質細胞、とくに癌関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts, CAFs) から分泌される Interleukin-6 (IL-6) が VEGF の分泌促進を介して腫瘍内での血管新生を促進し、この制御により癌の進展促進を抑制するという報告がある。一方、 $\omega$ 3 系脂肪酸である eicosapentaenoic acid (EPA) が、炎症性サイトカインや VEGF の発現を抑制するとの報告がある。【目的】EPA が、CAFs から産生される IL-6 と VEGF の分泌を抑制するかどうかを検討し、さらに癌間質相互作用に影響して血管新生を制御するかを検証した。

【方法・結果】癌組織から分離培養した線維芽細胞株を CAFs、正常大腸から分離培養した線維芽細胞株を colon normal fibroblasts (NFs) として用いた。これらの線維芽細胞株を用いて以下の実験を施行した。①線維芽細胞に EPA を添加した状態で培養し、細胞から分泌される IL-6 と VEGF の濃度を ELISA を用いて測定した。その結果、EPA ( $30\mu\text{M}$ ) を投与することで CAFs、NFs からの IL-6 と VEGF の産生は抑制された。②Western blot 法を用いて、EPA が CAFs に対して作用する機序を検討した。その結果、MAPK signaling pathway において、EPA ( $30\mu\text{M}$ ) 投与によって CAF 細胞中の ERK のリン酸化が抑制された。③CAFs の作用によって促進された血管新生が EPA によって抑制されるかどうかを Tube formation assay を用いて検討した。その結果、EPA が CAFs からの血管新生因子 (VEGF) の分泌を抑制することで、血管新生を抑制することが明らかとなった。

【考察】抗炎症作用を持つ EPA が、CAFs からの IL-6 と VEGF の分泌を抑制することが明らかとなった。またその作用機序は、MAPK signaling pathway において ERK のリン酸化を阻害することにより、IL-6 と VEGF の分泌を抑制していることを解明した。さらに EPA による CAFs からの VEGF 分泌抑制が血管新生の抑制を来すことが明らかとなった。

【結語】EPA が持つ抗炎症作用によって、癌間質細胞が引き起こす血管新生が抑制されるのではないかと考えられた。

【審査内容】主査の片岡教授から、①73 歳女性患者さんから CAF, NF を樹立しているが、これらの細胞への fibroblast 以外の細胞のコンタミはないか、②癌細胞から離れると、CAF または CAF のキャラクターを失うのではないか、③VEGF は A から G まで 7 種あるが、どのサブタイプを使用したか、など計 7 項目の質問があった。第一副査の高橋教授からは、①疫学的には  $\omega$ 3 脂肪酸摂取量が多いヒトは、大腸癌の予後が良いのか、データはあるのか、②ヒトが日常的に摂取している EPA の量はどのくらいか、③EPA はどのように代謝されるのか、など計 16 項目にわたり質問がなされた。第二副査の瀧口教授からは、①今後この研究はどのプランが考えられるか、②この研究はどのような社会貢献意義があるか、③大腸癌の腹腔鏡手術の国内外の現状はどうか、など計 6 項目にわたり質問がなされた。これらの質問に対し、一部返答に窮することもあったが、おおむね満足すべき回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると判断した。本研究は、EPA が CAFs からの IL-6 および VEGF 分泌を抑制することを見出し、EPA が腫瘍実質のみならず腫瘍間質にも作用することを明らかにした。よって、これらの新しい知見を報告している本論文の筆頭著者は博士 (医学) の学位を授与するに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 片岡洋望教授 副査 高橋 智教授、瀧口修司教授